

# Génétique moléculaire de l'hévéa

**Seguin M.<sup>1</sup>, Besse P.<sup>2</sup>, Lespinasse D.<sup>1</sup>, Lebrun P.<sup>1</sup>, Rodier-Goud M.<sup>1</sup>, Nicolas D.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> CIRAD-CP, BP 5035, 34032 Montpellier Cedex 1, France

<sup>2</sup> CSIRO, Division of tropical crops and pastures, Cunningham lab., 306 Carmody road, St. Lucia, QLD 4067, Australia

**G**âce au développement de la biologie moléculaire, il est aujourd'hui possible d'identifier un grand nombre de marqueurs génétiques pour toute espèce végétale ou animale.

Généticiens et sélectionneurs disposent de nouveaux outils, comme les empreintes génétiques, et de nouveaux concepts, comme les QTL<sup>(1)</sup> (Beckmann et Soller, 1986 ; Tanksley *et al.*, 1989) - ou la synthénie<sup>(2)</sup> (Bonierbale *et al.*, 1988, Moore *et al.*, 1993, Grivet *et al.*, 1994). L'approche moléculaire a conduit à des progrès considérables en génétique des plantes tropicales (Seguin, 1993 ; Lanaud et Nouaille, 1995 ; Meunier, 1995). De plus, les marqueurs moléculaires permettent une caractérisation très précoce du génotype des individus, atout particulièrement utile pour les espèces pérennes dont l'étude génétique est limitée par la longueur du cycle de reproduction et la lourdeur des essais au champ.

L'efficacité des marqueurs moléculaires de l'espèce végétale étudiée dépend des caractéristiques biologiques et, en premier lieu, du niveau de polymorphisme génétique des populations sauvages et domestiquées. Ce polymorphisme ne peut, bien

souvent, être correctement évalué que grâce au marquage génétique lui-même.

L'utilisation des marqueurs moléculaires a révélé un polymorphisme génétique élevé chez l'hévéa, supérieur à ce qu'on pouvait suspecter sur la base de la variabilité morphologique (Chevallier *et al.*, 1988 ; Low et Gale 1991 ; Seguin, 1993). Ceci a été montré pour la première fois grâce aux marqueurs isozymes (Chevallier, 1988 ; Paiva *et al.*, 1994a ; Seguin *et al.*, 1995). La diversité génétique existante au sein du matériel sélectionné (population Wickham) est apparue assez élevée pour permettre de distinguer les clones cultivés sur la base de leur profils isoenzymatiques (Lebrun et Chevallier, 1990 ; Seguin, 1992 ; Leconte *et al.*, 1994). De même, les isozymes sont utilisés pour l'étude du régime de reproduction et de la propagation du pollen chez l'hévéa (Leconte *et al.*, 1994 ; Paiva *et al.*, 1994b ; Sunderasan *et al.*, 1994).

Au laboratoire Agotrop<sup>(3)</sup>/Biotrop<sup>(4)</sup> du Cirad<sup>(5)</sup> à Montpellier, les analyses géné-

(1) Quantitative Trait Loci.

(2) Conservation de l'organisation des gènes sur les chromosomes entre espèces évolutivement proches.

(3) Analyse du génome des espèces tropicales.



tiques réalisées par isozymes ont été complétées à l'aide des marqueurs nucléiques (RFLP<sup>(6)</sup>, RAPD<sup>(7)</sup>, microsatellites), offrant toute une gamme d'outils applicables à la caractérisation de la diversité et à l'analyse du génome de l'hévéa (Seguin, 1993 et tableau 1).

## Caractérisation des ressources génétiques

Les marqueurs moléculaires ont été largement appliqués à l'étude de la diversité génétique des plantes cultivées (Andersen et Fairbanks, 1990). Ces recherches ont un intérêt général pour la connaissance de l'organisation génétique des espèces et pour l'appréciation de la diversité relative entre le matériel en sélection et les ressources génétiques que constituent les populations sauvages.

Ils ont également une utilité pour aider le sélectionneur à la gestion et à l'utilisation rationnelle de ces ressources génétiques disponibles en collection. Face à des milliers de génotypes non encore évalués, le sélectionneur et le généticien ont besoin d'informations sur la structuration de la diversité dans ces populations, afin de définir une stratégie optimale de conservation des ressources génétiques, d'échantillonner au mieux ces populations pour leur évaluation agronomique et, enfin, de choisir les plans de croisement et les géniteurs.

## Ressources génétiques de l'hévéa

Le Cirad-CP<sup>(8)</sup> collabore avec l'Idefor-DPL<sup>(9)</sup> de Côte d'Ivoire pour la gestion et

l'évaluation d'une des deux collections internationales d'hévéas (Nicolas *et al.*, 1988). Il s'agit d'une collection vivante de 3 500 génotypes de l'espèce cultivée *Hevea brasiliensis*, dont plus de 3 000 sont des clones sauvages issus de plusieurs prospections internationales en Amazonie, aire d'origine de l'hévéa. Elle compte en particulier 2 500 clones prospectés dans 16 districts de trois Etats du Brésil (carte) : Acre (Lins *et al.*, 1981), Rondonia (Gonçalves, 1981) et Mato Grosso (Paiva, 1981), et 340 provenant de la collection Schultes de Colombie (Nicolas, 1985).

Cette collection, comme toutes les collections d'hévéas, est très pauvre en génotypes des neuf autres espèces du genre *Hevea* qui appartiennent pourtant au même *pool* génétique primaire (Schultes, 1990).

Le *pool* de clones, issus de plusieurs décennies de sélection en Asie pour le rendement en latex (clones Wickham), constitue la presque totalité des huit millions d'hectares d'hévéas plantés au monde. Il a une base génétique réputée très restreinte et ne présente aucune résistance génétique à certaines maladies (Wycherley, 1969 ; Schultes, 1977). A l'inverse, les génotypes sauvages potentiellement intéressants pour ces caractères ont un rendement en latex très faible par rapport à celui des clones Wickham (Clément-Demange, 1988). De plus, on n'observe aucun hétérosis pour la production dans les croisements entre génotypes sélectionnés et sauvages. Le programme d'amélioration de l'hévéa mené par le Cirad et l'Idefor (Clément-Demange *et*

*al.*, 1990 et 1995) vise à l'utilisation de ces ressources génétiques dans un schéma de type sélection récurrente dont l'efficacité dépend de la connaissance de l'organisation génétique du *germplasm* hévéa.

## Etude de diversité par isozymes

La diversité génétique moléculaire de l'espèce *Hevea brasiliensis* a été caractérisée de façon précise. L'analyse avec des marqueurs isoenzymatiques a révélé 14 locus polymorphes, à l'aide de 12 systèmes isoenzymatiques (Chevallier, 1988 ; Chevallier *et al.*, 1988 ; Besse *et al.*, 1994 ; Seguin *et al.*, 1995). Les résultats soulignent, en premier lieu, la valeur des collections constituées en termes d'élargissement de la diversité génétique disponible pour l'amélioration : 35 allèles pour 11 locus polymorphes dans l'ensemble de la collection Wickham, contre 67 allèles pour 14 locus polymorphes dans les populations sauvages prospectées.

L'étude de diversité la plus complète a porté sur 419 clones pour 9 locus (Seguin *et al.*, 1995). La variabilité intra-population

(4) Biotechnologies appliquées à l'amélioration des plantes tropicales.

(5) Centre de coopération internationale en recherche agronomique pour le développement.

(6) Restriction Fragment Length Polymorphism.

(7) Random Amplified Polymorphic DNA.

(8) Département des cultures pérennes du Centre de coopération internationale en recherche agronomique pour le développement.

(9) Département plantes à latex de l'Institut des forêts de Côte d'Ivoire.

Tableau 1. Marqueurs moléculaires de l'hévéa : applications au CIRAD./ *Hevea molecular markers: applications at CIRAD.*

Marqueurs moléculaires <i>Molecular marker</i>	Type	Application	Référence
Isozymes/ <i>Isozyme</i>	14 gènes codants/ <i>14 coding genes</i>	Identification clonale/ <i>Clonal identification</i> Diversité génétique/ <i>Genetic diversity</i> Cartographie génétique/ <i>Genome mapping</i>	Lebrun et Chevallier 1990 ; Seguin 1992 ; Leconte <i>et al.</i> 1994 Chevallier 1988 ; Chevallier <i>et al.</i> 1988 ; Seguin <i>et al.</i> 1995 Seguin <i>et al.</i> en prép.
RFLP nucléaires, sondes homologues <i>Nuclear RFLPs, homologous probes</i>	Séquences d'ADN anonymes non répétées <i>Low copy anonymous DNA sequences</i>	Diversité génétique/ <i>Genetic diversity</i> Cartographie génétique/ <i>Genome mapping</i>	Besse <i>et al.</i> 1994 ; Seguin <i>et al.</i> 1995 Seguin <i>et al.</i> en prép.
RFLP gène ADN ribosomique <i>Ribosomal DNA gene RFLPs</i>	Séquence d'ADN hautement répétée <i>Highly repeated DNA sequence</i>	Diversité génétique/ <i>Genetic diversity</i>	Besse <i>et al.</i> 1993b
RFLP minisatellite <i>Minisatellite RFLPs</i>	Séquence d'ADN hautement répétée <i>Highly repeated DNA sequence</i>	Identification clonale/ <i>Clonal identification</i>	Besse <i>et al.</i> 1993a
RAPD/RAPDs	Séquences d'ADN répétées ou non, Sélectionnées au hasard <i>Low copy or repeated randomly selected DNA sequences</i>	Cartographie génétique/ <i>Genome mapping</i>	Lespinasse 1993
PCR ciblée sur microsatellites <i>Microsatellite tagged PCR</i>	Séquences d'ADN nucléaire non répétées <i>Low copy number DNA sequences</i>	Cartographie génétique/ <i>Genome mapping</i>	Lespinasse 1993 ; Seguin <i>et al.</i> en prép.



apparaît supérieure à la variabilité inter-population (i.e. entre Etats prospectés). Cependant, et à la différence des données morphologiques (Nicolas *et al.*, 1988), il apparaît une différenciation génétique entre populations en fonction de leur origine géographique (carte et figure 1A). On observe, par exemple, une divergence génétique nette entre les clones du Mato Grosso d'une part, à l'exception d'un district (MT/VB), et ceux de l'Acre et du Rondonia d'autre part, (Besse *et al.*, 1994).

Au niveau intra-Etat, une différenciation génétique s'observe également entre les districts de l'ouest et de l'est de l'Acre (Seguin comm. pers.). La population Wickham apparaît génétiquement plus proche de celle du Mato Grosso (figure 1A). Aucun allèle n'est spécifique de la collection Wickham et la richesse allélique est plus grande dans la collection amazonienne. La population Schultes de Colombie est divergente des autres populations amazoniennes, avec quelques allèles spécifiques. Ainsi, la struc-

turation génétique entre populations amazoniennes apparaît due à des différences de fréquences alléliques plutôt qu'à la présence d'allèles spécifiques de chaque population.

### Etude de diversité par RFLP

Une étude par RFLP, réalisée sur un plus petit nombre de clones : 92 amazoniens de l'Acre, du Rondonia et du Mato Grosso et 73 Wickham, a porté sur un plus grand nombre de locus. Les sondes RFLP utilisées furent d'une part, le gène codant pour les ARN<sup>(10)</sup> ribosomiques (ADNr<sup>(11)</sup> du blé et du radis, Besse *et al.*, 1993b) et d'autre part, 25 séquences non répétées dans le génome de l'hévéa (Besse *et al.*, 1994 ; Seguin *et al.*, 1995).

Les résultats confirment l'enrichissement génétique apporté par les populations amazoniennes et l'existence d'une structuration génétique forte en fonction de l'origine des prospections. En permettant l'accès à une plus grande part du génome,

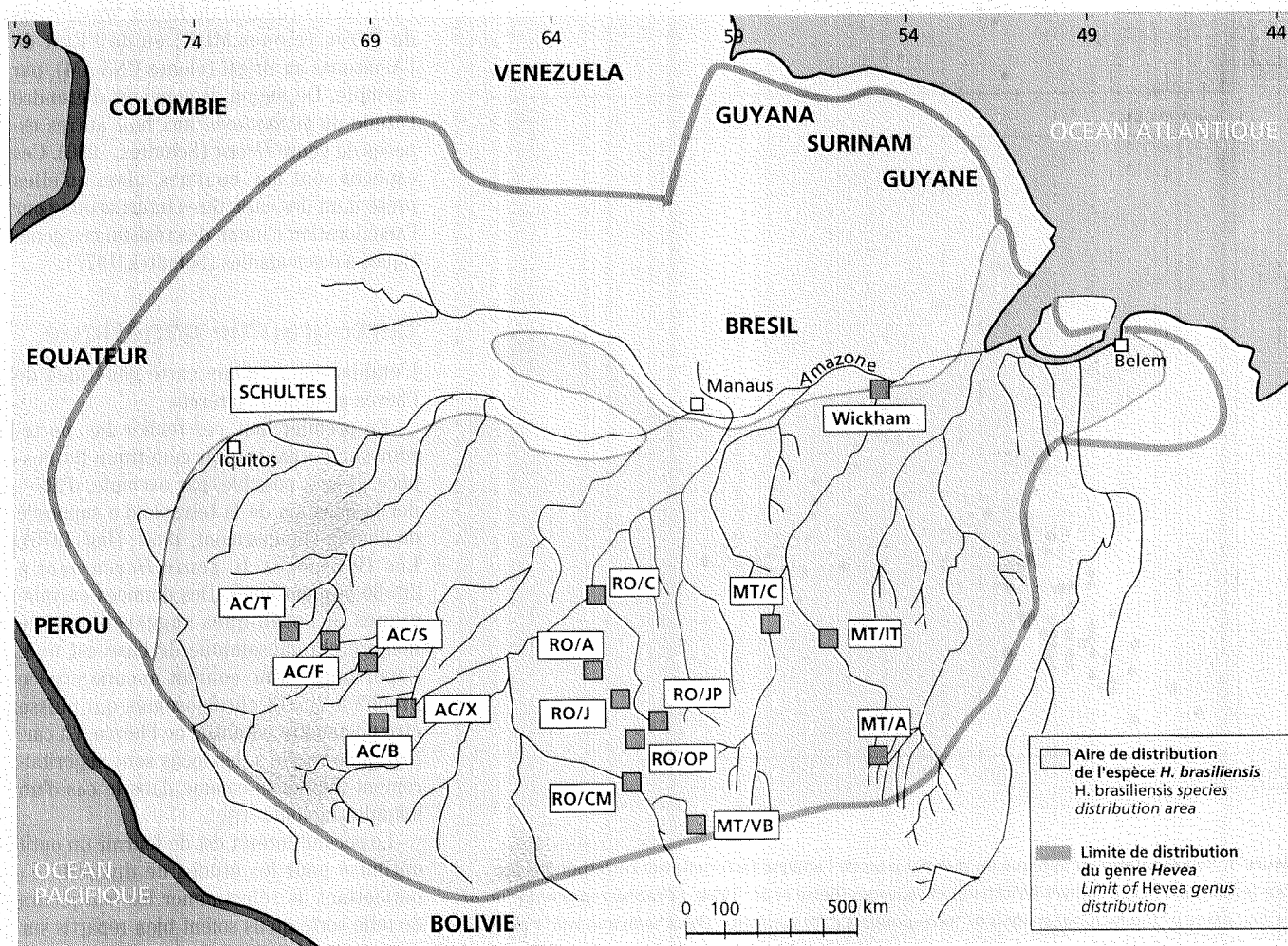
les RFLP apportent une information spécifique en révélant une divergence génétique très marquée de l'Acre par rapport aux autres populations amazoniennes (figure 1B). A l'inverse, les isozymes ont révélé spécifiquement la différenciation entre populations de l'ouest et de l'est de l'Acre (Seguin, comm. pers.).

Cependant, dans l'ensemble, l'étude par RFLP confirme et renforce les observations faites avec les isozymes, comme la divergence génétique entre Rondonia et Mato Grosso, à l'exception du district MT/VB qui se rattache au groupe Rondonia, et la similarité entre la population Wickham et celles du Mato Grosso.

Ainsi, l'utilisation de différents types de marqueurs moléculaires nous a fourni de façon spécifique et robuste une image précise de l'organisation de la diversité du *germplasm* hévéa. La compilation des ré-

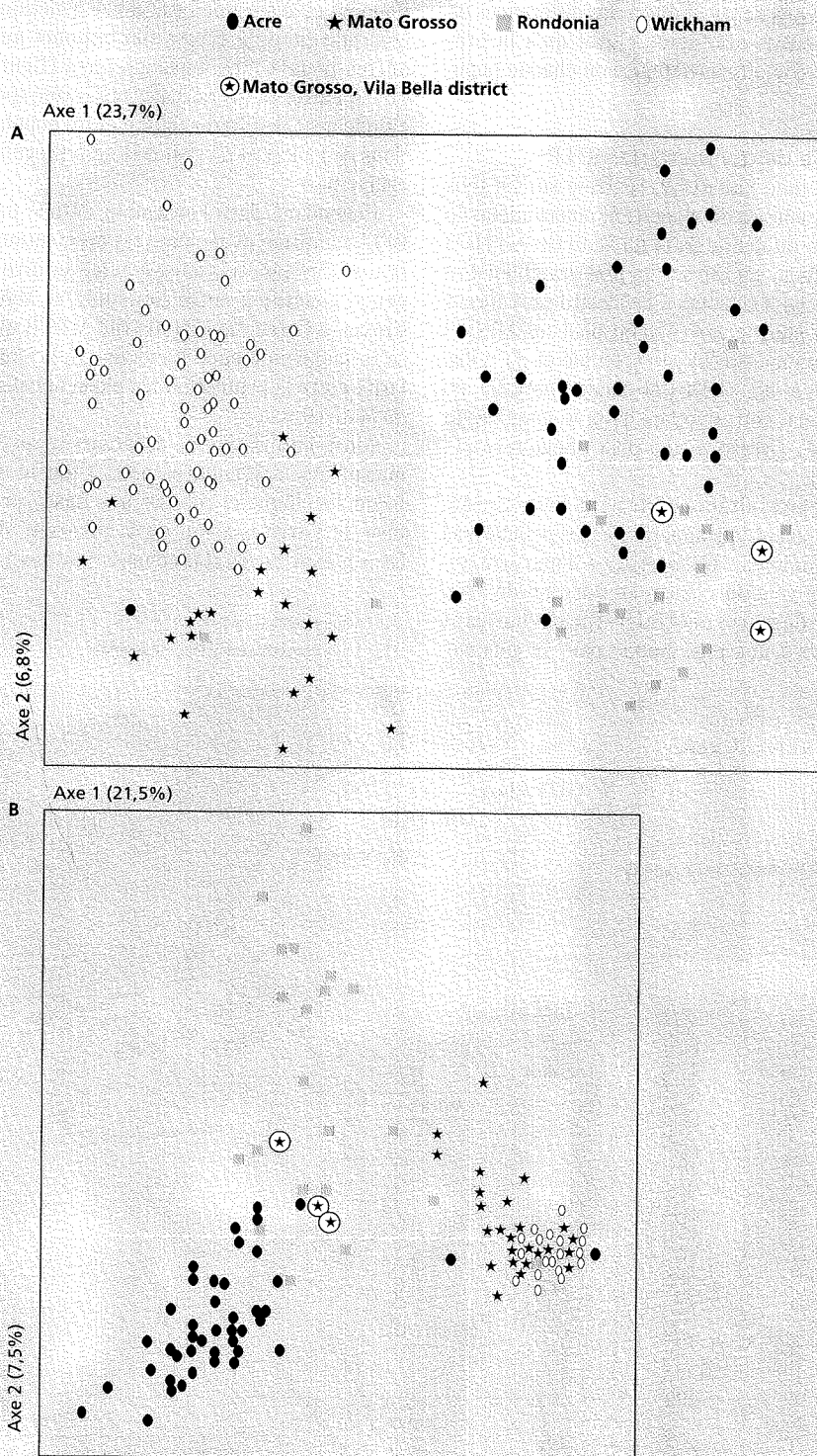
(10) Acide ribonucléique.

(11) Acide désoxyribonucléique ribosomique.



Origine géographique des clones d'hévéas analysés par isozymes ou RFLP pour l'étude de la diversité génétique.

Geographical origin of the Hevea clones analysed with isozymes or RFLP markers for genetic diversity assessment.



**Figure 1.** Représentation graphique du premier plan de l'analyse factorielle des correspondances pour les clones d'hévéa cultivés (Wickham) et sauvages (Besse et al., 1994). / Graphic representation of the first plane of the factorial analysis of correspondence for cultivated (Wickham) and wild *Hevea* clones (Besse et al., 1994).

A : variations alléiques en isozymes. / A : isozyme allelic variations.

B : variations de bandes RFLP. / B : RFLP band variations.

sultats obtenus grâce aux isozymes ou aux RFLP a conduit à définir six groupes de populations génétiquement divergents :

- groupe 1 : Acre Ouest ;
- groupe 2 : Acre Est ;
- groupe 3 : Rondonia + district Vila Bela du Mato Grosso ;
- groupe 4 : autres districts du Mato Grosso ;
- groupe 5 : collection Wickham ;
- groupe 6 : population Schultes de Colombie.

La connaissance de cette structuration est déterminante pour la mise en place d'une stratégie de conservation fondée sur la constitution de collections de taille réduite ou «core collections» (Brown, 1989). De même, elle permet d'optimiser le brassage génétique en sélectionnant des géniteurs en fonction de leur appartenance à des groupes génétiques différents.

Ces recherches devront être complétées par l'analyse moléculaire de la diversité de populations provenant d'autres régions de l'aire de distribution de *Hevea brasiliensis* du Pérou (clones MDF) ou de l'Etat de l'Amazonas au Brésil (clones CNS-AM), par exemple. De même, il convient d'étendre l'étude du *germplasm* aux huit autres espèces du genre *Hevea* (Schultes, 1990). Ces espèces sont mal connues, alors qu'elles présentent des caractères intéressants pour l'amélioration comme des résistances génétiques à des maladies (Schultes, 1977).

## Cartographie génétique

L'établissement d'une carte génétique de l'hévéa a plusieurs intérêts.

En premier lieu, ces recherches porteront sur l'organisation génétique de l'espèce. Il sera possible, par exemple, d'aborder la question de la tétraploidie supposée de l'hévéa (Bouharmont, 1960 ; Ong, 1975). Les 10 espèces du genre *Hevea* sont à  $2n=36$  chromosomes. Des données caryologiques et botaniques suggèrent que le nombre chromosomique de base est  $n=9$ . Cependant, on ne connaît aucune espèce proche à  $2n=18$  chromosomes qui puisse être un ancêtre potentiel de l'hévéa. La cartographie révèle si les locus sont majoritairement dupliqués comme dans le cas d'un amphitétraploïde strict.

Le second intérêt est de fournir un outil optimisé pour les études de diversité en permettant de sélectionner les marqueurs de telle sorte qu'ils soient bien répartis sur l'ensemble du génome.

Enfin, à plus long terme, l'objectif est de développer la sélection assistée par mar-



queurs (Gallais, 1993). Cette démarche permet, grâce à la construction d'une carte génétique dense, la localisation de gènes à effet majeur (QTL) déterminant des caractères d'intérêt agronomique et l'identification de marqueurs moléculaires étroitement liés, génétiquement, à ces gènes (Beckmann et Soller, 1986, Tanksley *et al.*, 1989).

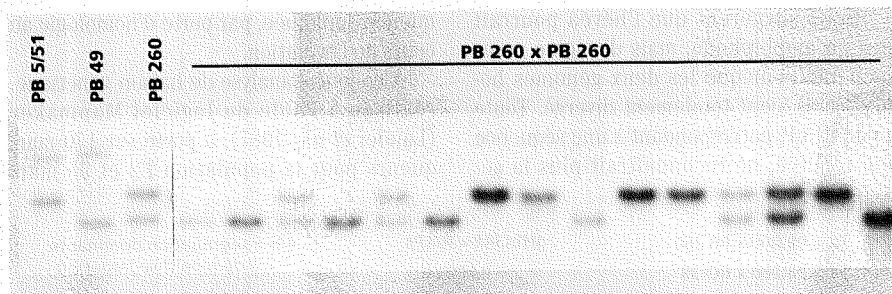
### Choix du matériel végétal

Pour réaliser un tel projet chez une espèce allogame pérenne comme l'hévéa, il faudrait disposer de populations en ségrégation adéquates. Or, tous les clones d'hévéa sont fortement hétérozygotes et il n'existe pas de lignée pure ni d'haploïdes doublés. Par ailleurs, si la sélection utilise la pollinisation contrôlée en routine, il est cependant difficile d'obtenir des descendance de grande taille en raison d'un très faible taux de fructification chez cette espèce.

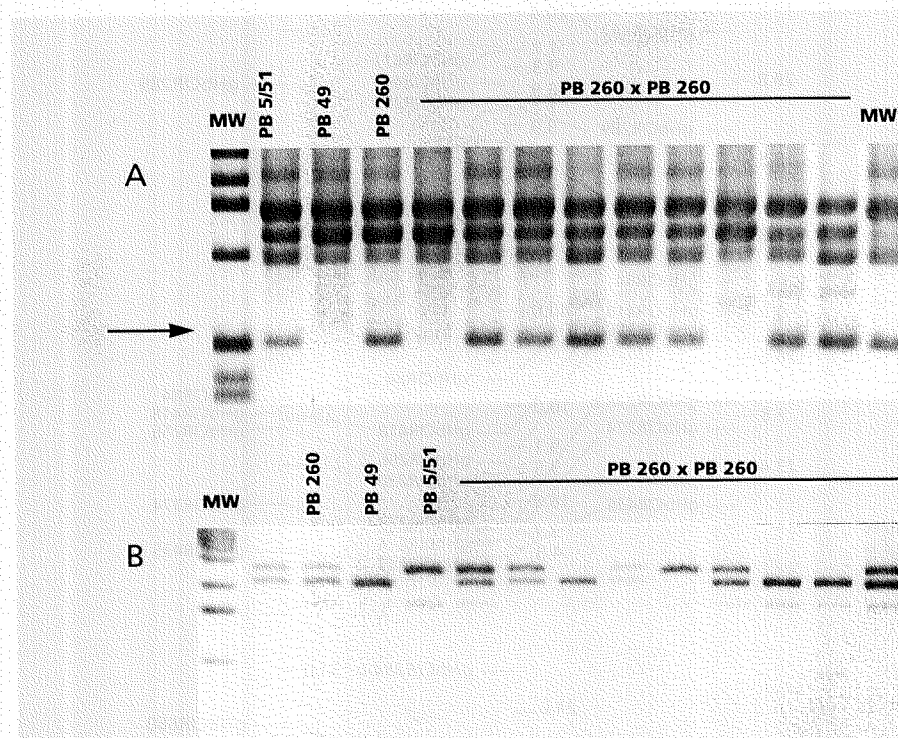
Nous avons pu, malgré tout, développer une stratégie de cartographie fondée sur trois populations en ségrégation, obtenues par pollinisation manuelle en Côte d'Ivoire. La première a été créée en autofécondant un clone asiatique (PB 260) haut-producteur en latex ; cette population comporte 73 descendants et correspond à un type de population (F2) classiquement utilisé en cartographie génétique des plantes. Elle servira à l'analyse des composantes génétiques de la production en latex et de la croissance. La seconde population de 108 descendants est issue d'un croisement F1 entre hétérozygotes (Lespinnasse, 1993), impliquant le même clone haut-producteur (PB 260) et un clone sauvage (RO 38), collecté dans l'Etat du Rondonia au Brésil en 1974 et manifestant une résistance à la maladie sud-américaine des feuilles (SALB<sup>(12)</sup>) due au champignon pathogène *Microcyclus ulei*. Ce type de population F1 est de plus en plus utilisé en cartographie chez les arbres, mais pose des problèmes particuliers d'analyse génétique. La troisième population est un rétrocroisement d'un des descendants F1, le clone IRCA 1159 de Côte d'Ivoire, sur le parent haut-producteur.

### Construction de la carte génétique

La première carte du génome de l'hévéa est en cours de construction sur la descendance F2 à l'aide de marqueurs isoenzymatiques, RFLP et RAPD (Lespinnasse, 1993). Les sondes utilisées proviennent d'une banque génomique d'hévéas, clonée au site PstI du vecteur pUC18 de la bactérie *E. Coli* (Besse *et al.*, 1994), et correspondent à des



**Figure 2.** Cartographie du génome de l'hévéa : ségrégation d'un marqueur RFLP codominant dans la descendance F2 (PB 260 x PB 260). Profil obtenu avec la sonde génomique PstI gHbCIR96, hybridée sur de l'ADN total digéré par l'enzyme EcoRI. / *Hevea genome mapping: segregation of one codominant RFLP marker in the F2 population (PB 260 x PB 260). Pattern obtained with the PstI genomic Hevea probe gHbCIR96, hybridized on total DNA restricted with the EcoRI enzyme.*



**Figure 3.** Cartographie du génome de l'hévéa : ségrégation de 2 marqueurs RAPD dans la descendance F2 (PB 260 x PB 260). / *Hevea genome mapping: segregation of 2 RAPD markers in the F2 population (PB 260 x PB 260).*

A : marqueur OPK19.b, la flèche indique la bande polymorphe à ségrégation dominante. / A : marker OK19.b; the arrow indicates the polymorphic band segregating as dominant locus.

B : marqueur ODP17 à ségrégation codominante. / B : marker OPD17 with codominant segregation.

séquences uniques. Les RAPD, à ségrégation le plus souvent dominante, sont moins informatifs dans une population F2 mais sont, néanmoins, intéressants en complément de marqueurs RFLP codominants. De plus, dans notre expérience, 10 % des marqueurs RAPD ségrègent de façon codominante. Des exemples de ségrégations obtenues dans cette descendance F2 pour des marqueurs RFLP et RAPD sont montrés dans les figures 2 et 3.

La grande majorité des sondes RFLP utilisées révèle des profils monolocus. Les locus dupliqués apparaissent extrêmement rares chez l'hévéa. Ainsi, le génome de *Hevea brasiliensis* se comporte comme un génome diploïde. En accord avec les travaux de cytogénétique montrant une structure tétraploïde (Bouharmont, 1960 ; Ong, 1975), nos

(12) *South American Leaf Blight.*

résultats suggèrent que l'hévéa pourrait être un amphiploïde, mais d'origine assez ancienne pour que les deux génomes homéologues aient totalement divergé. Toute sonde RFLP, correspondant à une séquence non répétée, ne reconnaît plus la sé-

quence dupliquée, par perte d'homologie au cours de l'évolution.

A ce jour, l'analyse de liaison génétique, réalisée à l'aide du logiciel Mapmaker (Lander *et al.*, 1987), a porté sur 170 marqueurs pour la population F2 et 95 mar-

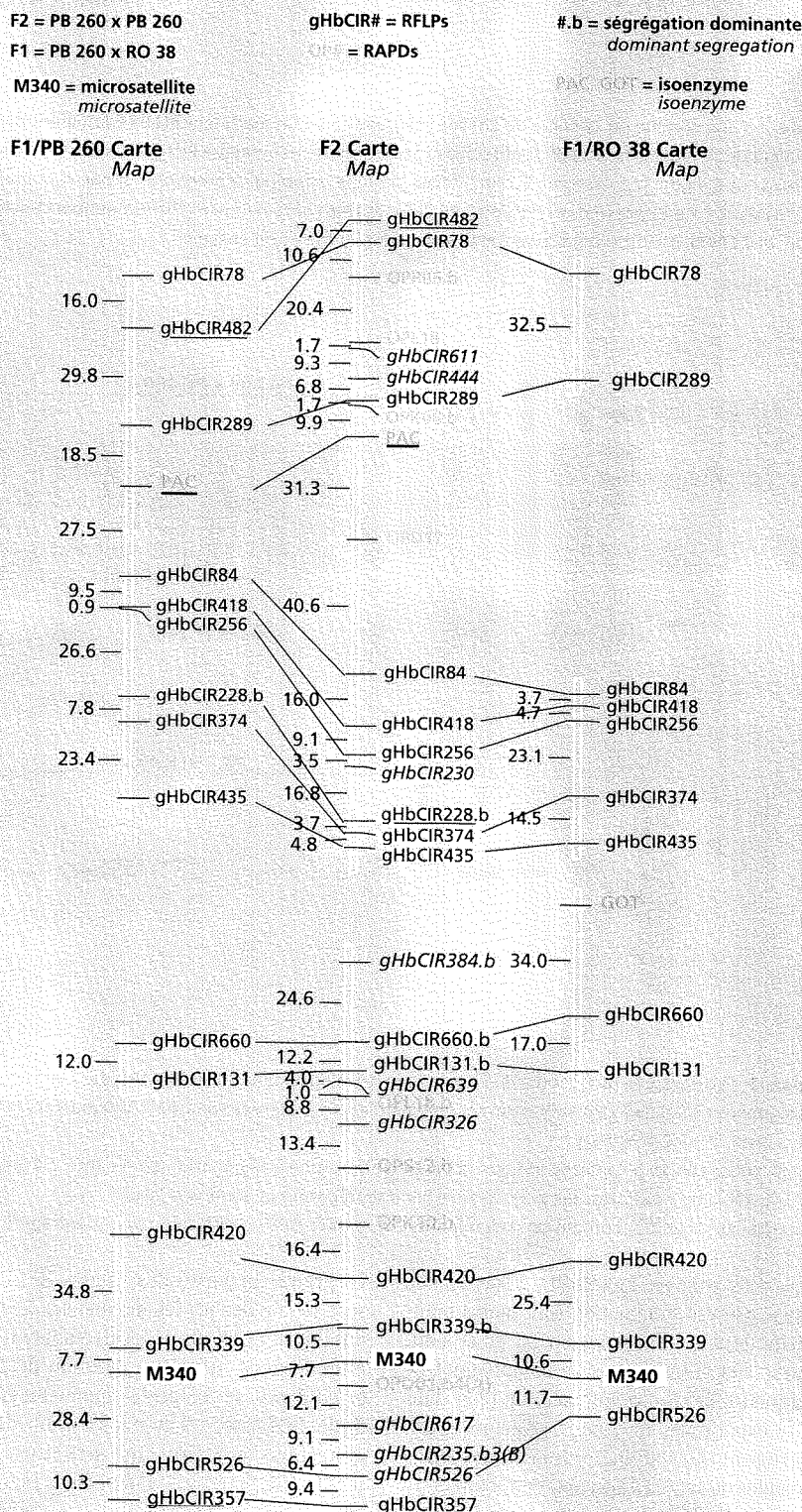
queurs pour la population F1, principalement des RFLP. La carte génétique obtenue comporte 30 groupes indépendants de marqueurs liés et 6 % de marqueurs non liés, pour une valeur seuil du LOD<sup>(13)</sup> de 3,0 (Seguin, comm. pers.). Le nombre de groupes de liaisons indépendants attendu est de 18, le génome de l'hévéa étant constitué de n=18 paires de chromosomes.

Le nombre de groupes de liaisons que nous avons obtenu peut s'expliquer par la taille importante du génome de l'hévéa. En appliquant la méthode de Hulbert sur nos données de cartographie, une première estimation donne une taille de ce génome de 3 500 cM<sup>(14)</sup>. Ceci correspond à une taille 4 à 5 fois supérieure à celle du génome du cacaoyer, par exemple (Meunier, 1995). De plus, l'obtention d'un nombre de groupes en excès s'observe chez d'autres espèces d'arbres comme le peuplier (*Populus* sp., Bradshaw *et al.*, 1994). Ces auteurs ont obtenu une carte comportant 35 groupes de liaison indépendants, pour n=19 paires de chromosomes, en analysant 343 marqueurs dans une descendance F2. Le surcroît de groupes de liaison constituant la carte génétique de l'hévéa pourrait s'expliquer par l'homozygotie relative du clone PB 260 dont certaines portions du génome ne seraient pas accessibles faute de marqueurs qui ségrègent.

Enfin, nous avons la confirmation de la validité de la carte génétique que nous avons construite en comparant les résultats pour des groupes de marqueurs analysés

### (13) Logarithme décimal du rapport des vraisemblances.

(14) Centimorgan.



**Figure 4.** Comparaison des cartes obtenues par analyse de ségrégation dans les 2 populations F1 et F2 pour 3 groupes de liaison indépendants chez l'hévéa. La liaison et l'ordre des marqueurs ont été déterminés à l'aide du logiciel Mapmaker aux valeurs seuil de LOD = 3.0 et  $\theta = 0.3$ . Les analyses de liaison sont réalisées indépendamment sur PB 260 et RO 38 dans la descendance F1. Les locus en italiques n'ont été analysés que dans la descendance F2. Les locus soulignés ne sont hétérozygotes que chez PB 260. / Comparison of the maps obtained by segregation analysis in the 2 F1 and F2 populations for 3 Hevea linkage groups. Linkage and order of loci were determined using Mapmaker software; LOD threshold = 3.0 and  $\theta = 0.3$ . The linkage analyses were performed independently for PB 260 and RO 38 in the F1 population. The loci in italics were only analysed in the F2 population. The loci underlined are heterozygous in PB 260 only.



dans les deux populations F2 et F1 simultanément. Dans la plupart des cas, les mêmes groupes de marqueurs, avec le même ordonnancement, sont obtenus par analyse de liaisons sur la F2 et sur la F1 (figure 4). Néanmoins, le travail de cartographie doit se poursuivre par ajout de marqueurs supplémentaires avec un objectif de 300 marqueurs minimum.

## Conclusions, perspectives

La recherche de marqueurs supplémentaires se fera par l'emploi d'autres sondes RFLP, la banque de sondes génomiques n'ayant pas encore été entièrement criblée, ainsi que d'autres amorces RAPD. Elle se fera également par la mise au point d'autres types de marqueurs moléculaires. En effet, notre laboratoire n'a pas seulement pour vocation de développer des outils et des connaissances intéressant l'amélioration génétique de l'hévéa, mais aussi d'évaluer les nouvelles techniques et les nouveaux types de marqueurs moléculaires qui ne cessent d'apparaître dans ce domaine en pleine évolution.

Nous avons, ainsi, travaillé récemment à l'identification de marqueurs par PCR<sup>(15)</sup> ciblée sur les séquences microsatellites. Ces séquences sont constituées de répétitions en tandem d'unités de 1 à 5 nucléotides de longueur. Le nombre de répétitions en un locus présente un taux de polymorphisme très élevé chez les végétaux (Morgante et Olivieri, 1993 ; Rafalski et Tingey,

1993). Ce polymorphisme peut être aisément analysé par PCR et se traduit par des variations de longueur des produits d'amplification révélées par électrophorèse. Nous avons identifié neuf marqueurs microsatellites chez l'hévéa qui ont pu être intégrés à la carte moléculaire RFLP. Ce type de marqueurs offre des perspectives intéressantes pour l'application du marquage génétique à grande échelle en raison des avantages techniques que propose la PCR par rapport aux RFLP. Les RFLP impliquent des protocoles et des équipements lourds qui limitent leur application et, de ce fait, les isozymes, bien que potentiellement moins puissants, gardent tout leur intérêt pour les études génétiques sur des espèces telles que l'hévéa. La PCR constitue donc une technique d'avenir pour obtenir des marqueurs génétiques de même qualité que les RFLP (marqueurs ADN, accès à l'ensemble du génome, codominance, indépendance du stade-organe) mais moins onéreux, quoique les coûts d'équipement et de fonctionnement pour la PCR restent, actuellement, supérieurs à ceux des isozymes.

D'autres techniques devront être évaluées pour l'analyse génétique de l'hévéa, telles que les AFLP, méthode autorisant l'identification de plusieurs dizaines de marqueurs polymorphes simultanément.

Par ailleurs, la cartographie génétique comparative est une approche intéressante pour l'hévéa. Une des retombées les plus importantes de la cartographie du génome chez les plantes a été la découverte d'une

grande conservation des gènes et de leur organisation sur les chromosomes (synthénie), entre des espèces aussi différentes que le maïs, le sorgho ou la canne à sucre (Bonierbale *et al.*, 1988 ; Moore *et al.*, 1993 ; Grivet *et al.*, 1994). Ceci implique que des découvertes en génétique moléculaire faites sur une espèce peuvent profiter à d'autres espèces évolutivement voisines. Pour l'hévéa, une telle approche peut être développée par comparaison avec le manioc (*Manihot esculenta*), autre espèce cultivée économiquement importante, appartenant à la même famille botanique des Euphorbiacées. ■

(15) Polymerase Chain Reaction.

Travaux réalisés au laboratoire Agetrop/Biotrop du Cirad à Montpellier, en collaboration avec l'Idéfor-DPL de Côte d'Ivoire, grâce au soutien de la Communauté Européenne (contrats STD) et de la société Michelin.

## Bibliographie / References

- Andersen W.R., Fairbanks D.J., 1990. Molecular markers: important tools for plant genetic resource characterization. *Diversity* 6 : 51-53.
- Beckmann J., Solter M., 1986. Restriction fragment length polymorphisms and genetic improvement of agricultural species. *Euphytica* 35 : 111-124.
- Besse P., Lebrun P., Seguin M., Lanaud C., 1993a. DNA fingerprints in *Hevea brasiliensis* (rubber tree) using human minisatellite probes. *Hereditas* 70 (3) : 237-244.
- Besse P., Seguin M., Lebrun P., Chevallier M.H., Nicolas D., Lanaud C., 1994. Genetic diversity among wild and cultivated populations of *Hevea brasiliensis* assessed by nuclear RFLP analysis. *Theor. Appl. Genet.* 88 (2) : 199-207.
- Besse P., Seguin M., Lebrun P., Lanaud C., 1993b. Ribosomal DNA variations in wild and cultivated rubber tree (*Hevea brasiliensis*). *Genome* 36 : 1049-1057.
- Bonierbale M., Plaisted R., Tanksley S., 1988. RFLP maps based on a common set of clones reveal modes of chromosomal evolution in potato and tomato. *Genetics* 120 : 1095-1103.
- Bouharmont J., 1960. Recherches taxonomiques et cytologiques chez quelques espèces du genre *Hevea*. Institut national pour l'étude agronomique du Congo Belge, Série scientifique (85), 64 p.
- Bradshaw H.D.J., Villar M., Watson B.D., Otto K.G., Stewart S., Stettler R.F., 1994. Molecular genetics of growth and development in populus. III. A genetic linkage map of a hybrid poplar composed of RFLP, STS, and RAPD markers. *Theor. Appl. Genet.* 89 : 167-178.
- Brown A.H.D., 1989. Core collections : a practical approach to genetic resources management. *Genome* 31 : 818-824.
- Chevallier M.H., 1988. Genetic variability of *Hevea brasiliensis* germplasm using isozymes markers. *J. Nat. Rubber Res.* 3 (1) : 42-53.
- Chevallier M.H., Lebrun P., Normand F., 1988. Approach of the genetic variability of germplasm using enzymatic markers. In : Compte-rendu du colloque exploitation-physiologie et amélioration de l'hévéa, Paris, France, 2-7 novembre 1988. Paris, France, IRCA-CIRAD, p. 365-376.
- Clément-Demange A., 1988. Agronomic variability of germplasm in Côte d'Ivoire. In : Compte-rendu du colloque exploitation-physiologie et amélioration de l'hévéa, Paris, France, 2-7 novembre 1988. Paris, France, IRCA-CIRAD, p. 403-421.
- Clément-Demange A., Legnaté H., Gnagne M., Nicolas D., 1990. Strategy for the breeding of *Hevea brasiliensis* germplasm in IRCA Côte d'Ivoire. In : IRRDB Symposium, Kunming, Chine, 5-6 octobre, 1990, p. 110-122.
- Clément-Demange A. et al., 1995. Hévéa : stratégies de sélection. *Plant. Rech. Dév.* 2 (3) : 5-20.
- Gallais A., 1993. La sélection assistée par marqueurs. *Sél. Fr.* 43 : 43-62.
- Gonçalves P.D.S., 1981. Expedição internacional à Amazônia no Território Federal de Rondônia para coleta de material botânico de seringueira (*Hevea brasiliensis*). Mission Report. Manaus,

- Brésil, EMBRAPA/CNSPD, 60 p. (document interne).
- Grivet L., D'Hont A., Dufour P., Hamon P., Roques D., Glaszmann J.C., 1994. Comparative genome mapping of sugar cane with other species within the Andropogoneae tribe. *Heredity* 73 : 500-508.
- Lanaud C., Nouaille C., 1995. Un bel avenir pour les plantes tropicales. *Biofutur* 146 : 57-62.
- Lander E.S., Green P., Abrahamson J., Barlow A., Daly M.J., Lincoln S.E., Newburg L., 1987. MAP-MAKER : an interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. *Genomics* 1 : 174-181.
- Lebrun P., Chevallier M.H., 1990. Starch and polyacrylamide gel electrophoresis of *Hevea brasiliensis*: a laboratory manual. Montpellier, France, IRCA-CIRAD, 55 p.
- Leconte A., Lebrun P., Nicolas D., Seguin M., 1994. Electrophorèse : application à l'identification clonale de l'hévéa. *Plant. Rech. Dév.* 1 (2) : 28-36.
- Lespinnas D., 1993. Recherche de marqueurs en vue d'une cartographie génétique chez *Hevea brasiliensis*. Mémoire de DEA, ENGREF, Paris, France, 50 p.
- Lins A.C.R., Silva G.P. da, Nicolas D., Ong S.H., Melo C.C., Santos M.R. dos, 1981. Report of the Acre team in the 1981 joint IRRDB/Brasil *Hevea* germplasm expedition. Mission Report. Manaus, Brésil, EMBRAPA/CNSPD, 24 p.
- Low F., Gale M., 1991. Development of molecular markers for *Hevea*. *J. Nat. Rubber Res.* 6 : 152-157.
- Meunier J., 1995. Biotechnologies : quelles perspectives pour les cultures pérennes tropicales ? *Plant. Rech. Dév.* 2 (1) : 7-18.
- Moore G., Gale M.D., Kurata N., Flavell R.B., 1993. Molecular analysis of small grain cereal genomes : current status and prospects. *Bio/Technology*, 11 : 584-589.
- Morgante M., Olivieri A.M., 1993. PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. *Plant J.* 3 (1) : 175-182.
- Nicolas D., 1985. Acquisition of *Hevea* material derived from Colombian Schultes collections. In : IRRDB senior plant breeders meeting, Kuala Lumpur, Malaysia, 18-19 oct. 1985, 11 p.
- Nicolas D., Chevallier M.H., Clément-Demange A., 1988. Contribution to the study and evaluation of new germplasm for use in *Hevea* genetic improvement. In : Compte-rendu du colloque exploitation-physiologie et amélioration de l'hévéa, Paris, France, 2-7 novembre 1988. Paris, France, IRCA/CIRAD, p. 335-352.
- Ong S.H., 1975. Chromosome morphology at the pachytene stage in *Hevea brasiliensis* - a preliminary report. In : Proceedings of the International Rubber Conference, Kuala Lumpur, Malaysia, 20 oct. 1975, (2) p. 3-12.
- Paiva J.R. de, 1981. A coleta de material sexuado a assexuado nos seringais nativos do Estado do Mato Grosso. Mission Report. Manaus, Brésil, EMBRAPA-CNSPD, 26 p. (document interne)
- Paiva J.R. de, Kageyama P.Y., Vencovsky R., 1994a. Genetics of rubber tree (*Hevea brasiliensis* (Willd. ex A.D. de Juss.) Müll. Arg.). 2. Mating system). *Silvae Genet.* 43 : 373-376.
- Paiva J.R. de, Kageyama P.Y., Vencovsky R., Contel P.B., 1994b. Genetics of rubber tree (*Hevea brasiliensis* (Willd. ex A.D. de Juss.) Müll. Arg.). I. Genetic variation in natural populations. *Silvae Genet.* 43 : 307-312.
- Rafalski J.A., Tingey S.V., 1993. Genetic diagnostics in plant breeding: RAPDs, microsatellites and machines. *Trends Genet.* 9 (8) : 275-280.
- Schultes R.E., 1977. Wild *Hevea*: an untapped source of germplasm. *J. Rubber Res. Inst. Sri Lanka* 54 : 227-257.
- Schultes R.E., 1990. A brief taxonomic view of the genus *Hevea*. Kuala Lumpur, Malaysia, MRRDB (50) 57 p.
- Seguin M., 1992. Marqueurs moléculaires et identification clonale chez l'hévéa : développement des empreintes génétiques par RFLP et application in situ des isozymes. In : Procès-verbal de la 17e réunion du Comité scientifique et technique du caoutchouc, Montpellier, France, 27 mars 1992. Montpellier, France, IRCA/CIRAD, p. 58-67.
- Seguin M., 1993. Utilisation des marqueurs moléculaires pour l'amélioration génétique des plantes tropicales. Exemples d'applications au CIRAD. In : Le progrès génétique passe-t-il par le repérage et l'inventaire des gènes ? H. Chly et Y. Demarly éd., Paris, France. John Libbey Eurotext, p. 73-87.
- Seguin M., Besse P., Lebrun P., Chevallier M.H., 1995. *Hevea* germplasm characterization using isozymes and RFLP markers. In : Proceedings of the symposium on population genetics and genetic conservation, IUFRO Meetings, Carcan-Maubuisson, France, 24-28 août 1992, SPB Academic Publishing, p. 129-134.
- Sunderasan E., Wickneswari R., Aziz M.Z.A., Yeang H.Y., 1994. Incidence of self- and cross-pollination in two *Hevea brasiliensis* clones. *J. Nat. Rubber Res.* 9 : 253-257.
- Tanksley S., Young N., Paterson A., Bonierbale M., 1989. RFLP mapping in plant breeding. New tools for an old science. *Bio/Technology* 7 : 257-264.
- Wycherley P.R., 1969. Breeding of *Hevea*. *J. Rubber Res. Inst. Malaya* 21 : 38-55.



# Hevea molecular genetics

Seguin M.<sup>1</sup>, Besse P.<sup>2</sup>, Lespinasse D.<sup>1</sup>, Lebrun P.<sup>1</sup>, Rodier-Goud M.<sup>1</sup>, Nicolas D.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Cirad-CP, BP 5035, 34032 Montpellier Cedex 1, France

<sup>2</sup> CSIRO, Division of tropical crops and pastures, Cunningham lab., 306 Carmody road, St. Lucia, QLD 4067, Australia

Knowledge of *Hevea* genetic organization has made substantial progress with the use of molecular marking techniques. The characterization of the genetic diversity of wild *Hevea* populations is essential for rational management of genetic resources. Similarly, the establishment of a genome map opens up new prospects for genetic improvement.

**W**ith the development of molecular biology techniques, it is now possible to identify a large number of genetic markers for any plant or animal species.

Geneticists and breeders therefore have new tools at their disposal, such as genetic fingerprinting, and new concepts such as QTL<sup>(1)</sup> (Beckmann and Soller, 1986; Tanksley *et al.*, 1989) - or syntheny<sup>(2)</sup> (Bonierbale *et al.*, 1988; Moore *et al.*, 1993; Grivet *et al.*, 1994). The molecular approach has led to considerable progress in tropical crop genetics (Seguin, 1993; Lanaud and Nouaille, 1995; Meunier, 1995). Molecular markers also enable very early characterization of the genotype of individuals, which is particularly useful in the case of perennial species for which genetic studies are limited by the length of the reproduction cycle and the size of the field trials.

Molecular marker efficacy for a given species depends on its biological characteristics and primarily the level of genetic polymorphism in wild and cultivated populations. Quite often, such polymorphism can only be correctly assessed by genetic marking itself.

The use of these molecular markers has revealed high genetic polymorphism in *Hevea*, greater than might have been suspected from its morphological variability (Chevallier *et al.*, 1988; Low and Gale, 1991; Seguin, 1993). This was first revealed through the development of isozyme markers (Chevallier, 1988; Paiva *et al.*, 1994a; Seguin *et al.*, 1995). Genetic diversity within selected material (the Wickham population) appeared to be high enough to be able to distinguish between cultivated clones according to their isoenzymatic banding patterns (Lebrun and Chevallier, 1990; Seguin, 1992; Leconte *et al.*, 1994) and isozymes are used to study the

reproductive system and pollen dispersal in *Hevea* (Leconte *et al.*, 1994; Paiva *et al.*, 1994b; Sunderasan *et al.*, 1994).

At the Cirad<sup>(3)</sup> Agetrop<sup>(4)</sup>/Biotrop<sup>(5)</sup> laboratory in Montpellier, genetic analyses using isozymes were completed by nucleic markers (RFLP<sup>(6)</sup>, RAPD<sup>(7)</sup>, microsatellites), offering a wide range of tools for use in characterizing diversity and analysing the *Hevea* genome (Seguin, 1993 and table 1).

## Characterization of genetic resources

Molecular markers have been widely used to study the genetic diversity of cultivated plants (Andersen and Fairbanks, 1990). Such research is of general interest, to acquire information about the genetic organization of species and assess the relative diversity between material undergoing selection and the genetic resources offered by wild populations.

It is also valuable in helping breeders to manage and make rational use of the genetic resources available in collections. Faced with thousands of genotypes yet to be evaluated, breeders and geneticists need information on the structuring of diversity in these populations, in order to define an optimum genetic resources management strategy, sample these populations in the best way possible for their agronomic assessment and choose crossing plans and parents.

## Hevea genetic resources

Cirad-CP<sup>(8)</sup> is working with Idefor -DPL<sup>(9)</sup> in Côte d'Ivoire to manage and evaluate one of the two international *Hevea* collections (Nicolas *et al.*, 1988). It is a living collection containing 3,500 genotypes of the cultivated species *Hevea brasiliensis*, more than 3,000 of which are wild clones from several international surveys in Amazonia, where *Hevea* originated from. In particular, it includes 2,500 clones from 16 districts of three states in Brazil (map): Acre (Lins *et al.*, 1981), Rondonia (Gonçalves, 1981)

and Mato Grosso (Paiva *et al.*, 1981), along with 340 from the Schultes collection in Colombia (Nicolas, 1985).

This collection, like all the others in the world, has very few genotypes belonging to the other nine species of the *Hevea* genus, though they belong to the same primary genetic pool (Schultes, 1990).

The pool of clones, resulting from several decades of selection in Asia for latex yields (Wickham clones), makes up virtually all the eight million hectares of rubber planted worldwide. It has a genetic base reputed to be very narrow, with no genetic resistance to certain diseases (Wycheley, 1969; Schultes, 1977). On the other hand, the wild genotypes, which are potentially worthwhile for these characters, produce very little latex compared to the Wickham clones (Clément-Demange, 1988). Moreover, no heterosis is seen for yields in crosses between selected and wild genotypes. The *Hevea* breeding programme implemented by Cirad and Idefor (Clément-Demange *et al.*, 1990) intends to use these genetic resources in a recurrent selection type scheme whose efficiency depends on the knowledge of the genetic organization of *Hevea* germplasm.

## Diversity study using isozymes

Genetic diversity at molecular level in the *Hevea brasiliensis* species has been precisely characterized. Analysis by isoenzymatic markers

(1) Quantitative Trait Loci.

(2) The conservation of gene organization on the chromosomes between evolutionarily close species.

(3) International Centre for Cooperation in Development-Oriented Agricultural Research

(4) Analysis of the genome of tropical species.

(5) Biotechnologies applied to tropical plant breeding.

(6) Restriction Fragment Length Polymorphism.

(7) Random Amplified Polymorphic DNA.

(8) Tree Crops Department of Cirad.

(9) Latex Plants Department of the *Institut des forêts*, Côte d'Ivoire.

The content of this article was covered in a paper presented at the IRRDB Symposium: Physiological and molecular aspects of the breeding of *Hevea brasiliensis*, held in Penang (Malaysia) from 6th to 7th November 1995.

has revealed 14 polymorphic loci, using 12 isoenzymatic systems in *Hevea brasiliensis* (Chevallier, 1988; Chevallier *et al.*, 1988; Besse *et al.*, 1994; Seguin *et al.*, 1995). First of all, the results emphasize the value of the collections built up in terms of enhancing the genetic diversity available for breeding: 35 alleles for 11 polymorphic loci in the Wickham collection as a whole, as opposed to 67 alleles for 14 polymorphic loci in the wild populations surveyed.

The most wide-ranging diversity study involved 419 clones (Seguin *et al.*, 1995). Within-population variability appeared to be greater than between-population variability (i.e. between surveyed states). However, unlike the morphological data (Nicolas *et al.*, 1988), genetic differentiation appeared between populations depending on their geographical origin (map and figure 1A). For example, clear genetic divergence was seen on the one hand between clones from Mato Grosso, apart from one district (MT/VBA) and on the other between those from Acre and Rondonia (Besse *et al.*, 1994).

Within the states, genetic differentiation was also seen between the eastern and western districts of Acre (Seguin, pers. comm.). The Wickham population appeared to be genetically closer to Mato Grosso (figure 1A). No allele was specific to the Wickham collection and allelic wealth was greater in the Amazon collection. The Schultes population from Colombia seemed to be divergent from the other Amazon populations, with a few specific alleles. Thus, the genetic structuring between Amazon populations seemed to be due to differences in allelic frequencies rather than to the existence of alleles specific to each population.

### Diversity study using RFLP

An RFLP study was carried out on a smaller number of clones: 92 wild clones from Acre, Rondonia and Mato Grosso, and 73 Wickham clones, but a larger number of loci was involved. The RFLP probes used were the gene coding for ribosomal RNA<sup>(10)</sup> (wheat and radish rDNA<sup>(11)</sup>, Besse *et al.*, 1993b), and 25 low copy sequences in the *Hevea* genome (Besse *et al.*, 1994; Seguin *et al.*, 1995).

The results confirmed the genetic enhancement derived from the Amazon populations and the existence of strong genetic structuring depending on the origin of the survey material. However, by providing access to a larger part of the genome, RFLP thereby provided specific information by revealing very marked genetic divergence in Acre compared to the other Amazon populations (figure 1B). On

the other hand, isozymes specifically revealed genetic differentiation between populations from western and eastern Acre (M. Seguin, pers. comm.).

Be that as it may, on the whole the RFLP study confirmed and corroborated the observations made with isozymes, such as genetic divergence between Rondonia and Mato Grosso, apart from the MT/VB district, which corresponds to the Rondonia group, and the similarity between the Wickham and Mato Grosso populations.

Hence, using different types of molecular markers specifically and clearly provided us with an accurate picture of how *Hevea* germplasm diversity is organized. Six genetically divergent groups of populations can be identified in *Hevea* germplasm after compiling the results obtained with isozymes or RFLP:

- group 1: West Acre;
- group 2: East Acre;
- group 3: Rondonia districts + Vila Bela district in Mato Grosso;
- group 4: Other Mato Grosso districts;
- group 5: Wickham collection;
- group 6: Schultes Colombian collection.

Knowledge of this structuring is decisive for implementing a preservation strategy based on core collections (Brown, 1989). Likewise, it enables optimum genetic mixing by selecting parents according to the genetic groups to which they belong.

This research needs to be completed by molecular analysis of the diversity of populations from other regions in the *H. brasiliensis* range, in Peru (MDF clones), or Amazonas state in Brazil (CNS-AM clones) for example. Likewise, the germplasm study should be extended to the other eight species of the *Hevea* genus (Schultes, 1990). Little is known about these species, though they have interesting traits for breeding, such as genetic resistance to diseases (Schultes, 1977).

### Genome mapping

Drawing up a *Hevea* linkage map is useful for several reasons.

Firstly, this research will provide information about the genetic organization of the species. For example, it will be possible to tackle the question of the assumed tetraploidy of *Hevea* (Bouharmont, 1960; Ong, 1975). The 10 species of the *Hevea* genus have  $2n=36$  chromosomes. Karyological and botanical data suggest a basic chromosome number of  $n=9$ , but there is no known species close to  $2n=18$  chromosomes that could be a potential ancestor of *Hevea*. Mapping reveals whether loci are duplicated in their majority, as in the case of a strict amphitetraploid.

Secondly, it provides an optimized tool for diversity studies, so that markers can be chosen in such a way as to be distributed throughout the genome.

Lastly, and in the longer term, the aim is to develop marker-assisted breeding (Gallais, 1993). By drawing up a dense linkage map, this approach will make it possible to localize major effect genes (QTL) determining traits of agronomic interest and to identify molecular markers that are closely genetically linked to these genes (Beckmann and Soller, 1986; Tanksley *et al.*, 1989).

### Choice of planting material

The problem when embarking on such a project with a perennial cross-fertilizing species such as *Hevea* is to have populations with adequate segregation. All *Hevea* clones are highly heterozygous and there are no pure lines or doubled haploids. In addition, whilst assisted pollination is routinely used in breeding, it is still difficult to obtain large numbers of progenies due to the very low fruiting rate in this species.

Despite this, we succeeded in developing a mapping strategy based on three segregating populations obtained by hand pollination in Côte d'Ivoire. The first was created by selfing an Asian clone (PB 260) with high latex yields; this population comprises 73 progenies and corresponds to a type of population (F2) conventionally used in plant linkage mapping. It will be used for genetic analyses of latex production and growth components. The second population of 108 progenies was obtained from an F1 cross between heterozygous clones (Lespinasse, 1993), involving the same high-yielding clone (PB 260) and a wild clone (RO 38), collected in Rondonia State, Brazil, in 1974 and showing some resistance to South American Leaf Blight (SALB) caused by the pathogenic fungus *Microcyclus ulei*. This type of F1 population is increasingly being used in the linkage mapping of trees, but involves specific genetic analysis problems. The third population is a backcross of one of the F1 progenies, the IRCA 1159 clone from Côte d'Ivoire, onto the high-yielding parent.

### Constructing the linkage map

The first *Hevea* genetic map is currently being established on the F2 progeny using isoenzymatic markers, RFLP and RAPD (Lespinasse, 1993). The probes used come from a *Hevea* genome bank, cloned at site PstI of vector pUC18 of the bacterium *E. coli* (Besse *et al.*, 1994), and correspond to single sequences. The RAPD, usually with dominant segregation, are less informative in an F2 population, but are still useful as a complement to codominant RFLP markers. Moreover, in our experience, 10% of the

(10) Ribonucleic Acid.

(11) Ribosomal Deoxyribonucleic Acid.



RAPD markers segregate as codominant loci. Examples of segregation observed on the F2 progenies with RFLP or RAPD markers are shown in figures 2 and 3.

The great majority of the RFLP probes reveal monolocus pattern and segregation. Duplicated loci are very rare in *Hevea*. Thus, the *Hevea brasiliensis* genome behaves as a diploid one. In accordance with the cytogenetic study revealing the tetraploid structure of the genome (Bouharmont, 1960; Ong, 1975), our results suggest that *Hevea* could be an amphiploid of sufficiently ancient origin for the homeologous chromosomes to have diverged widely. Each RFLP probe, corresponding to a low copy sequence, would no longer recognize the duplicated sequence, due to loss of homology during evolution.

To date, 170 markers for the F2 population and 95 for the F1, mainly RFLP, have undergone genetic linkage analysis using the Mapmaker software (Lander *et al.*, 1987). The resulting map comprises 30 independent linkage groups at an LOD<sup>(12)</sup> threshold of 3.0 (Seguin, pers. comm.). The expected number of independent linkage groups is 18, since the *Hevea* genome comprises  $n=18$  chromosome pairs.

The number of linkage groups we found could be explained by the great genome size of *Hevea*. We estimated this size at 3500 cM<sup>(13)</sup>, using the Hulbert *et al.* method on our mapping data. This corresponds to a genome 4 to 5 times larger than the cocoa tree genome for instance (Meunier, 1995). In addition, excess in the number of linkage groups is similarly observed for other tree species such as poplar (*Populus* sp., Bradshaw *et al.*, 1994). These authors identified 35 linkage groups, for a genome with  $n=19$  chromosome pairs, by analysing 343 markers in one F2 population. The excess linkage groups in the *Hevea* genetic map may be due to the relative homozygosity of clone PB 260, of which certain

portions of the genome are apparently inaccessible because of a lack of segregating markers.

Moreover, we have confirmation of the validity of our *Hevea* map in the comparison of the results for marker groups analysed simultaneously in the two populations, F1 and F2. In most cases, the same linkage groups, with the same order of loci, are found by linkage analysis performed in F2 and F1 populations (figure 4). Nevertheless, the mapping work has to be continued by adding further markers, with a target of at least 300 markers.

## Conclusion-prospects

The search for additional markers will be continued using other RFLP probes, as the genome probe bank has yet to be completely screened, along with other RAPD primers. It will also involve the development of other types of molecular markers. In addition to developing tools and providing more information for *Hevea* genetic improvement, our laboratory also assesses the endless stream of new techniques and new types of molecular markers appearing in this rapidly expanding field.

We recently worked on identifying markers by PCR<sup>(14)</sup> tagged on microsatellite sequences. These sequences consist of tandem arrays of 1 to 5 nucleotide long units. The number of arrays in a locus presents a very high polymorphism rate in plants (Morgante and Olivieri, 1993; Rafalski and Tingey, 1993). This polymorphism is easily analysed by PCR and results in variations in the length of the amplification products revealed by electrophoresis. We have identified nine microsatellite markers in *Hevea* that have been integrated into the RFLP molecular map. Such markers open up interesting prospects for using genetic marking on a wide scale, given the technical advantages offered by PCR compared to RFLP. RFLP requires sophisticated protocols and equipment which limit its application, hence isozymes remain totally valid for genetic studies

on species such as *Hevea*, although they are potentially less powerful. PCR is therefore a technique with a promising future for obtaining genetic markers of the same quality as RFLP (DNA markers, access to the entire genome, codominance, stage-organ independence), but less expensively, though equipment and operating costs for PCR markers are currently higher than for isozymes.

Other techniques will need to be assessed for genetic analysis of *Hevea*, such as AFLP, by which several dozen polymorphic markers can be identified simultaneously.

Comparative genetic mapping is also an interesting approach for *Hevea*. One of the most important repercussions of genome mapping in plants was the discovery of substantial conservation of genes and of their organization on the chromosomes (synteny) between species as different as maize, sorghum or sugar cane (Bonierbale *et al.*, 1988; Moore *et al.*, 1993; Grivet *et al.*, 1994). This means that molecular genetics discoveries for one species could be applicable to evolutionarily similar species. For *Hevea*, such an approach can be developed by comparing it with cassava (*Manihot esculenta*), another economically important cultivated species belonging to the same botanical family, the Euphorbiaceae. ■

Work carried out at the Cirad Agetrop/Biotrop laboratory in Montpellier, in conjunction with Idefor-DPL in Côte d'Ivoire, with support from the European Union (STD contracts) and the Michelin company.

(12) Decimal logarithm of the ratio of probabilities.

(13) Centimorgan.

(14) Polymerase Chain Reaction.

## Résumé

Dans le cadre d'un programme de sélection réalisé en collaboration avec l'Idefor (Côte d'Ivoire), le Cirad-CP a mis au point, dans le laboratoire Agetrop/Biotrop à Montpellier (France), des recherches sur la génétique moléculaire de l'hévéa. Les principaux objectifs consistent à améliorer les connaissances de la structuration génétique du genre *Hevea* et de fournir de nouveaux outils et méthodes aux planteurs et aux sélectionneurs.

Des marqueurs biochimiques (isozymes) et moléculaires (RFLP, RAPD, microsatellites) ont été mis au point et appliqués, avec succès, à l'hévéa dans trois domaines principaux : l'identification clonale, la caractérisation des ressources génétiques et la cartographie du génome.

Cet article fait le point sur les études de diversité et d'analyse du génome de l'hévéa.

## Abstract

In connection with a breeding programme conducted in collaboration with Idefor (Côte d'Ivoire), Cirad-CP carried out research on *Hevea* genetics at the Agetrop laboratory in Montpellier (France). The aims were firstly to increase knowledge of the genetic organization of the *Hevea* genus, and secondly, to provide new tools and methods for smallholders and breeders.

Biochemical (isozymes) and molecular markers (RFLPs, RAPDs, microsatellites) were developed and successfully applied to rubber trees for three main purposes: clonal identification, germplasm characterization and genome mapping.

This paper reports the results of genetic diversity assessment and *Hevea* genome analysis.

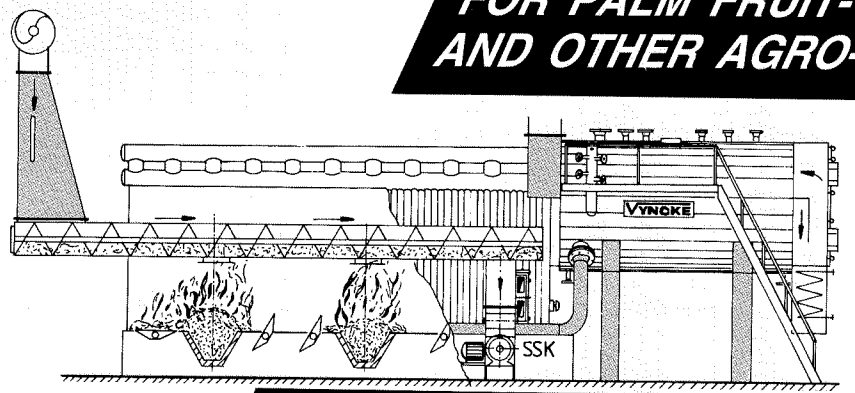
## Resumen

En el marco de un programa de selección realizado en colaboración con el Idefor (Côte d'Ivoire), el Cirad-CP desarrolló, en el laboratorio Agetrop/Biotrop en Montpellier (Francia), investigaciones sobre la genética molecular del hevea. Los principales objetivos siendo mejorar los conocimientos de la estructuración genética del género *Hevea* y proporcionar nuevas herramientas y métodos a los productores y a los seleccionadores.

Se puntualizaron marcadores bioquímicos (isozimas) y moleculares (RFLP, RAPD, microsatelites) y se aplicaron con éxito al hevea en tres áreas principales: la identificación clonal, la caracterización de los recursos genéticos y la cartografía del genoma.

Este artículo recapitula los estudios de diversidad y de análisis del genoma del hevea.

## VYNCKE BOILERS: SPECIALLY DESIGNED FOR PALM FRUIT-WASTE AND OTHER AGRO-WASTE



capacities  
0.5 - 35 tons/h

- Combined water tube-fire tube boiler: sturdy, reliable design offering easy access and maintenance.
- Underfeed stoker: stable and complete combustion.
- Ash removal by dumping grate.
- Preassembled in our workshops: simple erection on site.

Over  
1,000 references  
in solid fuel  
combustion.

QUALITY SINCE 1912

# VYNCKE®

vyncke nv  
gentsesteenweg 224  
b-8530 harelbeke - belgium  
tel (32.56) 71 82 31  
fax (32.56) 70 41 60